ANTIBODY PLATFORM FOR MICROALBUMIN DETECTION AND ABO BLOOD TYPING BY ANTIBODIES ARRAYS BASED SURFACE PLASMON RESONANCE IMAGING

NONGLUCK HOUNGKAMHANG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2012

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

ANTIBODY PLATFORM FOR MICROALBUMIN DETECTION AND ABO BLOOD TYPING BY ANTIBODIES ARRAYS BASED SURFACE PLASMON RESONANCE IMAGING

MISS NONGLUCK HOUNGKAMHANG 5038620 SCME/D

Ph.D. (MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING PROGRAMME)

THESIS ADVISORY COMMITTEE : TOEMSAK SRIKHIRIN, Ph.D., BOONSONG SUTAPAN, Ph.D., MONGKOL KUNAKORN, M.D., PIMPAN KITPOKA, M.D.

ABSTRACT

In the first part, surface plasmon resonance (SPR) technique was applied to measure the microalbumin in urine. Various combinations of capture antibody and signal enhanced antibody on the mixed self assembly monolayer (mSAM) and carboxymethyldextran (CMD) surface were compared. The most suitable combination was a monoclonal anti-human serum albumin (anti-HSA) as the capture antibody immobilized on CMD surface, providing the specificity of the surface toward HSA binding, and polyclonal anti-HSA as the signal enhanced molecule with the detection limit of 0.001 μg/mL. The amount of the HSA presence in the urine was quantified by using the four parameters fitting (4PL). The detection was in the range of 0.02 to 2.5 μg/mL of HSA in urine sample. The result from the SPR technique was quantitatively consistent with a standard turbidimetric method with coefficient of determination (R^2) 0.94.

In the second part, the application of SPR in ABO blood-typing was investigated. Anti-A, anti-B and anti-AB antibodies were immobilized on CMD surface. A red blood cells (RBCs) sample flowed through the surface using a cross-flow immobilization technique and blood group was determined via the immunological interaction between immobilized antibody and antigens on the RBCs surface. The surfaces were regenerated using 5.0 mM NaOH and can be used a minimum of 20 times. The results from blood-typings were consistent with the results obtained from standard agglutination tests.

In the third part, SPR was applied for Rh (D) blood typing. Monoclonal anti-D antibody (mixed of IgG and IgM type) was covalently immobilized on CMD surface. RBCs samples flowed over the surface and the Rh blood type were determined based on the presence or absence of D antigen on RBCs surface. The optimum flow rate for D antigen detection was 10 μL/min, providing signal of Rh positive RBCs that clearly separate from Rh negative RBCs. All 44 samples of Rh blood typed by SPR were in good agreement with standard agglutination tests.

In the last part, SPR was applied for ABO-Rh blood typing in one sensor chip. The suitable condition for serum grouping using immobilized synthetic blood group A and B antigen on CMD surface was studied. All ligands were immobilized on CMD as integrated platform for cell grouping, serum grouping and Rh (D) typing. The method for ABO-Rh blood typing using a single injection of 1:5 dilution of whole blood in PBST buffer was demonstrated. ABO and Rh blood were typed at the same time in 20 minutes. This technique allows the easy and convenient method for ABO-Rh blood typing with saving time and cost by the surface can be regenerated with 20 mM NaOH. The surface can be used up to 10 times.

KEY WORDS: SPR / MICROALBUMINURIA / ANTIGEN ANTIBODY BINDING / ABO BLOOD TYPING / ANTIBODY ARRAYS

110 pages

การพัฒนารูปแบบของแอนติบอดิสำหรับการตรวจวัดไมโครอัลบูมินและการจำแนกหมู่เลือดชนิดเอบีโอในลักษณะอาร์เรย์โดยเทคนิคเอสพีอาร์แบบภาพ

ANTIBODY PLATFORM FOR MICROALBUMIN DETECTION AND ABO BLOOD TYPING BY ANTIBODIES ARRAYS BASED SURFACE PLASMON RESONANCE IMAGING

นงลักษณ์ หวงกำแหง 5038620 SCME/D

ปร.ด. (วิทยาศาสตร์และวิศวกรรมวัสดุ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : เติมศักดิ์ ศรีศิรินทร์, Ph.D., บุญส่ง สุตะพันธ์, Ph.D., มงคล คุณากร, M.D., พิมพรรณ กิจพ่อค้า, M.D.

บทคัดย่อ

ในส่วนที่ 1 เทคนิคเอสพีอาร์ถูกประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดปริมาณไมโครอัลบูมินในปัสสาวะ (microalbuminuria) โดยการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการวัดปริมาณอัลบูมิน (HSA) โดยการตรึงแอนติบอดิและการขยายสัญญาณด้วยแอนติบอดิแบบต่างๆ บนพื้นผิว mixed self assemble monolayer (mSAM) และ carboxymethyl dextran (CMD) พบว่าพื้นผิวที่เหมาะสมที่สุดคือพื้นผิว CMD ที่ตรึงด้วยแอนติบอดิ anti-HSA ชนิดโมโนโคลนอล ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวัด HSA และการขยายสัญญาณด้วยแอนติบอดิ anti-HSA ชนิดโพลิโคลนอล โดยมีค่าการตรวจวัดต่ำที่สุดอยู่ที่ 0.001 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณของ HSA ในปัสสาวะถูกคำนวณโดยใช้ 4PL fitting ซึ่งมีความสามารถในการตรวจวัดอยู่ในช่วง 0.02-2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของ HSA ในปัสสาวะที่วัดได้จากเทคนิคเอสพีอาร์สอดคล้องกับวิธีมาตรฐานเดิม (การวัดความขุ่น) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) 0.94

ในส่วนที่ 2 เกี่ยวข้องกับการใช้เทคนิคเอสพีอาร์ในการจำแนกหมู่เลือดชนิดเอบีโอทำโดยตรึง anti-A, anti-B และ anti-AB แอนติบอดิลงบนพื้นผิว CMD เลือดตัวอย่างถูกไหลผ่านพื้นผิวในลักษณะอาร์เรย์ ซึ่งหมู่เลือดถูกจำแนกจากสัญญาณจำเพาะที่เกิดขึ้นระหว่างคู่แอนติบอดิที่ถูกตรึงและแอนติเจนบนผิวเม็ดเลือดแดง พื้นผิวสามารถล้างและใช้ซ้ำได้อย่างน้อย 20 รอบ ด้วย 5 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เทคนิคเอสพีอาร์ให้ค่าความถูกต้องเหมือนเทคนิคมาตรฐานเดิม

ในส่วนที่ 3 เป็นการประยุกต์ใช้เทคนิคเอสพีอาร์สำหรับการตรวจวัดหมู่เลือด Rh (D) โดยการตรึงแอนติบอดิ anti-D ชนิดโมโนโคลนอล ผสมระหว่าง IgG และ IgM ลงบนพื้นผิว CMD จากนั้นเลือดตัวอย่างถูกไหลผ่านพื้นผิวและหมู่เลือด Rh ถูกจำแนกตามการปรากฏของแอนติเจนดีบนพื้นผิวเม็ดเลือดแดง พบว่าอัตราการไหลของเม็ดเลือดแดงที่เหมาะสมอยู่ที่ 10 ไมโครลิตรต่อนาที ซึ่งให้ค่าสัญญาณการวัดหมู่เลือด Rh บวก แตกต่างจากหมู่เลือด Rh ลบ อย่างชัดเจน เลือดตัวอย่างทั้งหมด 44 ตัวอย่างถูกนำมาทดสอบด้วยเทคนิคเอสพีอาร์ พบว่าให้ค่าที่สอดคล้องกันกับเทคนิคมาตรฐานเดิม

ส่วนสุดท้ายรวมการตรวจวัดหมู่เลือดชนิดเอบีโอและอาร์เอช บนเซนเซอร์แผ่นเดียวด้วยเทคนิคเอสพีอาร์ รวมถึงศึกษาเพิ่มเติมในส่วนการตรวจหาแอนติบอดิ anti-A และ anti-B ในพลาสมา (serum grouping) ด้วยการตรึงแอนติเจนเอและบีสังเคราะห์บนพื้นผิวเดกทรานซ์ จากนั้นแอนติบอดิและแอนติเจนสำหรับใช้จำแนกหมู่เลือดชนิดเอบีโอและอาร์เอช ถูกตรึงบนพื้นผิว CMD ด้วยสภาวะที่เหมาะสม การจำแนกหมู่เลือดระบบเอบีโอและอาร์เอชในครั้งเดียวโดยการฉีดเลือดตัวอย่างที่ไม่ได้ปั่นแยกที่เจือจาง 1:5 เท่าใน PBST บัฟเฟอร์ หมู่เลือดเอบีโอและอาร์เอช ถูกจำแนกในคราวเดียวกันภายใน 20 นาที เทคนิคนี้ให้วิธีที่ง่ายและสะดวกสำหรับจำแนกหมู่เลือดระบบเอบีโอและอาร์เอช พร้อมทั้งประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายเนื่องจากสามารถล้างพื้นผิวและใช้ซ้ำได้ด้วย 20 มิลลิโมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์ พื้นผิวสามารถใช้ซ้ำได้อย่างน้อยถึง 10 ครั้ง

Copyright by Mahidol University

110 หน้า